

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/DE05/000589

International filing date: 29 March 2005 (29.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: DE
Number: 10 2004 016 020.1
Filing date: 28 March 2004 (28.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 04 August 2005 (04.08.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 10 2004 016 020.1

Anmeldetag: 28. März 2004

Anmelder/Inhaber: Novosom AG, 06120 Halle/DE

Bezeichnung: Serumstabile amphotere Liposomen

IPC: A 61 K, B 01 J

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juli 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Remus

40 anionisch nach leicht kationisch und die Vorteile eines kationischen Transfektionsreagenzes werden ausgenutzt. In der WO 02/66012 A2 sind diese Liposomen erstmals beschrieben. Die WO 02/66490 und WO 02/66489 (WO 03

40 methoxy-ethyl RNA (MOE), Peptide nucleic acid (PNA), N3'-P5'
Phosphoroamidate (NP), 2'-fluoro-arabino nucleic acid (FANA), Locked
nucleic acid (LNA), Morpholino phosphoroamidate (MF), Cyclohexene nucleic

40 Verwendung von amphoteren Lipiden oder durch geeignete Mischungen von pH-sensitiven kationischen und anionischen Lipiden, wie sie in der WO 02 066012 offenbart werden. Werden amphotere Lipide verwendet, so beträgt der

DPPC/HistDG/Chol	40:20:40
DPPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40

POPC/HcChol/Chol	50:15:35
DPPC/HcChol/Chol	50:15:35
POPC/HistPS/Chol	50:15:35
DPPC/HistPS/Chol	50:15:35
POPC/AC/Chol	50:15:35
DPPC/AC/Chol	50:15:35
DPPC/HistChol/Chol	50:15:35
POPC/HistChol/Chol	50:15:35
POPC/HistSuccDG/Chol	50:15:35
DPPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35
POPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35
DPPC/HistSucc/Chol	50:15:35

Für eine Verwendung der erfindungsgemäßen Formulierungen als Arzneimittelträger kann es zweckmäßig sein, Substanzen, die die Haltbarkeit erhöhen, die zur Regulierung des osmotischen Drucks dienen, zuzusetzen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Liposomen kann durch Verfahren nach dem Stand der Technik erfolgen, wie beispielsweise Extrusion durch Membranen definierter Porengröße, Ethanolinjektion oder Hochdruckhomogenisation. Beispielhafte Ausführungen sind in den Beispielen gegeben.

Nicht eingeschlossener Wirkstoff wird abgetrennt. Dazu werden geeignete Trennverfahren verwendet, so dass der Wirkstoff zu mindestens 90% im Liposom eingeschlossen ist und weniger als 10% des Wirkstoffes sich außerhalb des Liposoms befinden. Hierfür können chromatographische Verfahren, Zentrifugation, Dialyse oder Ultrafiltration verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen können zur therapeutischen Behandlung eines Säugetieres verwendet werden. Auch zur therapeutischen Behandlung von Menschen können sie verwendet werden. Insbesondere zur parenteralen Applikation, bevorzugt zur intravenösen Applikation sind die erfindungsgemäßen liposomalen Formulierungen geeignet.

Anschließend wird die Erfindung an Beispielen weiter erläutert, ohne auf diese Ausführungen begrenzt zu sein.

Abbildungen

Abbildung 1: Chemische Formeln von Lipiden, die sich amphoteren Liposomen, gemessen durch Freisetzung des Fluoreszenzmarkers CF (Carboxyfluorescein)

5

Abbildung 2: Belegung einer 96-well Mikrotiterplatte für den Serumsstabilitätstest, gemessen wird die Freisetzung des Fluoreszenzmarkers CF

10. Abbildung 3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme neben einer Phasenkontrastaufnahme zur Zelllokalisierung.

Der Anteil des eingeschlossenen Cy5.5-anti-CD40-ODN (Antisense-Oligonukleotid) wird nach Abtrennung des frei vorliegenden Wirkstoffes

durch dreimalige Sedimentation in der Ultrazentrifuge bei 60000 x g über 45 min fluoreszenzspektroskopisch ermittelt.

Die Einschlusseffizienz des Oligonukleotids wird durch Bestimmung des Lipidgehaltes und der fluorimetrischen Cy5.5-Bestimmung im Verhältnis zu zum Materialeinsatz von Lipid und ODN gesehen und beträgt für die Formulierung 53%.

Beispiel 3

Bestimmung der Serumstabilität

Als Modellwirkstoff wird Carboxyfluorescein (CF) eingesetzt, der wie Oligonukleotide bei physiologischem pH negativ geladen ist. Die Serumstabilität der CF-gefüllten Liposomen wird über den Zeitraum von insgesamt 24 h bei 37°C beobachtet. Es wird dabei die Freisetzung des CF aus den Liposomen über die Zeit per Fluoreszenzmessung beobachtet. Es können 3 verschiedene Liposomenformulierungen pro 96-well-Platte getestet werden. Zur Bestimmung der prozentual freigesetzten Menge an CF wird die in Puffer inkubierte Probe sowohl direkt vermessen (Basiswert) als auch nach Öffnung der Liposomen durch Zugabe von Triton (Tritonwert oder 100%-Wert). In einem Gesamtvolumen von 500 µl werden sterilfiltriertes Serum und 1 mM Liposomen zusammengegeben. Derselbe Ansatz wird als Kontrolle mit Puffer anstelle des Serums vorbereitet.

Eine 96-well-Platte wird folgendermaßen vor den jeweiligen Probennahmen vorbereitet: in die Wells einer Zeile, Spalten 1, 3, 5, 7, 9 und 11 werden jeweils 5 µl Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5) vorgelegt. In die Spalten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 jeweils 5 µl 10 % Triton X-100.

Die 96-well-Platte wird wie in Figure 2 dargestellt belegt. In die Spalten 1-6 werden je 5 µl der in Puffer inkubierten Liposomen gegeben, in die Spalten 7-12 die in Serum inkubierten. Zu den 5 µl Probe plus 5 µl Puffer bzw. Triton werden 290 µl Puffer gegeben. Es wird jeweils wieder ein Basis- und ein Triton-Wert genommen. Auf diese Weise kann man drei Formulierungen über 8 Zeitpunkte pro Platte testen. Die Zeitpunkte sind die folgenden:

null, null, 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 24 h.

Für die Messungen der Fluoreszenz wird ein Plattenreader mit 485/530 nm Filtern verwendet. Aus den gemessenen Fluoreszenzdaten werden die relativen Freisetzungswerte errechnet, indem der Tritonwert 100% Freisetzung entspricht. Tabelle 1 zeigt eine Reihe von getesteten Formulierungen. Es zeigt sich, dass nur erfindungsgemäße Zusammensetzungen eine hohe Serumstabilität besitzen.

U

Beispiel 4

Einschluß von FITC-ODN (fluoreszenzmarkierte Antisense-DNA)

Das verwendete Antisense-Oligonukleotid (ODN) ist ein 18-mer Phosphorothioat mit einer FITC-Markierung am 5'-Ende (Fluorescein-isothiocyanat). Liposomen mit FITC-ODN wurden hergestellt: 0,5 ml einer 1 mM Lipidlösung mit 9 µg ODN. Zwei Ansätze mit unterschiedlichem Verhältnis der kationischen Lipiden zu anionischer ODN: 3:1 und 4,5:1

- Jeweils DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol 20/10/30/40

- Hydratisierungs- bzw. ODN-Lösung: 10 mM NaAc pH 4,5, 300 mM Sucrose

10 - Zur Abtrennung nicht eingeschlossenen ODNs wurden die Liposomen in einem diskontinuierlichen Sucrosegradienten mit 0, 0,8 und 1,2 M Sucrose in Hep¹⁰, NaCl¹⁵⁰ flotiert.

Bestimmung des Einbaus an FITC-ODN aus der Summe der gemessenen FITC-ODN - Fluoreszenzen (100 %) bzw. des Input und daraus abgeleitet dem Verhältnis von freier zu eingebauter Fluoreszenz:

%	Liposomen	Lipo-Reste	Puffer/Sucr..	freie ODN.	gesamt
3:1	43,3	14,7	5,4	36,6	100,0
4,5:1	46,3	10,7	4,5	38,5	100,0

13

Beispiel 4

Einschluß von siRNA (anti GFP) in amphotere Liposomen

Als Ladungsverhältnis von kationischem Lipid zu anionischer siRNA wird 5:1 bis 10:1 gewählt. Die siRNA (in 10 mM Hepes, 10 mM NaCl pH 7,2) wird mit dem Hydratisierungspuffer (10 mM NaAcetat, 10 mM NaCl, 280 mM Sucrose, pH 4,5) vermischt und auf den Lipidfilm gegeben, sodass eine 5-10 mM Lipidsuspension entsteht. Die Lipide werden durch Ultraschallbehandlung von der Kolbenwand gelöst (max. 10 min). Hydratisiert wird für 15 min bei Raumtemperatur (POPC als Trägerlipid, bzw. bei 50 °C bei DMPC, DPPC als Trägerlipid). Es folgt ein mindestens dreimaliges Einfrieren bei -70 °C (10 min für 1 ml Volumen, 30 min für Volumina bis 15 ml) und wieder Auftauen im Wasserbad (Temperatur wie beim Hydratisieren).

Der Kolben wird aufgetaut und bei größeren Volumina werden 3 ml der Lösung entnommen (in 8 ml Glasröhrchen). Der restliche Ansatz wird wieder bei -70 °C eingefroren. Die Extrusion erfolgt durch 100 nm-Filter. Anschließend wird der pH Wert mit 1/10 Volumen 1 M Hepes auf pH 8,0 eingestellt.

Flotation der Liposomen:

Die Liposomen Fraktionen werden mit dem selben Volumen 2,4 M Sucrose in H₂O versetzt (d.h. es entsteht eine 1,2 M Lösung). Den Gradienten schichtet man mit Puffer (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5), darunter 0,8 M Sucrose in Puffer und zuunterst die Liposomen in 1,2 M Sucrose in H₂O. Das Volumen des Gradienten beträgt maximal 4,5 ml. Die Flotation erfolgt bei Raumtemperatur für 45 min bei 50.000 rpm in einer Ultrazentrifuge. Die Liposomen, welche sich zwischen der 0,8 M Sucrose- und der Pufferschicht befinden, werden abgenommen.

RNA-Mengenbestimmung mit Ribo Green RNA Quantitation Reagenz

Der Assay wird im Endvolumen von 200 µl durchgeführt. Zuerst fertigt man eine Eichreihe der siRNA zwischen 1 ng und 10 ng an (10-100 µl 100 ng/ml siRNA).

Das Ribo Green verdünnt man 1:2000 in TE-Puffer. Zu jedem Ansatz werden 100 µl Ribo Green zugegeben, dann inkubiert man 5 min bei Raumtemperatur und misst die Fluoreszenz bei 485/520 nm. Die Ansätze werden mit je 4 µl 10 % Triton (Endkonzentration 0,2 mM) versetzt. Diese Eichkurve dient später für die Bestimmung der in Liposomen eingeschlossenen Menge an siRNA. Nach ca. 15 min misst man noch einmal die Fluoreszenz. Die Ergebnisse werden graphisch in ein Diagramm eingetragen (je eine Kurve mit und ohne Triton) und Eichgeraden mit den dazu gehörigen Gleichungen aus den Werten generiert.

Die Liposomen verdünnt man in zwei verschiedenen Konzentrationen (z.B. 1:50 und 1:100) und misst 2-3 verschiedene Volumina der Verdünnungen (z.B. 5, 10 und 15 µl der Verdünnungen ad 100 µl TE plus 100 µl Ribo Green Reagenz)

114

ohne und mit Triton. Die errechnete Konzentration der siRNA einer Formulierung muss bei den verschiedenen Messungen in etwa übereinstimmen. Ist dies nicht der Fall, lag man mit der siRNA-Menge außerhalb der Eichkurven und sollte diese Werte nicht in die Berechnung der Konzentration einfließen lassen. Die Effizienz, mit siRNA in verschiedenen Formulierung eingeschlossen werden konnte zeigt die Tabelle X.

Tabelle 2: Einschluss siRNA antiGFP in amphotere Liposomen

Formulierung	Zusammensetzungen	Effizienz
POPC/MoChol/Chems/Chol	50:10:30:10	8,7%
DMPC/HistDG/Chol	50:10:40	8,7%
DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	20:10:30:40	6,1%
DMPC/DOTAP/DGSucc/Chol	20:10:30:40	20,5%
DMPC/HistChol/Chol	50:10:40	56,4%
POPC/MOChol/DPPS/Chol	40:10:10:40	58,4%
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	20:10:30:40	8,1%
DMPC/MOChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	21%
POPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	16,8%
DMPC/AC/Chol	50:10:40	30,4%
DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	30,1%
DMPC/isoHistSuccDG/Chol	50:10:40	21,1%
DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	40:10:10:40	49%
DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	46%

Test von siRNA-haltigen Liposomen im Serum

Unmodifizierte siRNA wird im Serum sehr schnell abgebaut. Um den schützenden Effekt der Liposomen auf die siRNA zu untersuchen, wird wie im folgenden dargestellt vorgegangen.

Die Konzentration der eingeschlossenen siRNA wird vor dem Serumtest bestimmt. Für jeden zu testenden Zeitpunkt werden Liposomen mit je 4 µg siRNA pro Zeitpunkt eingesetzt. Getestete Zeitpunkte: Null, 1 h, 2 h und 4 h.

Die Liposomen mit 4 µg siRNA im Innern werden auf 60 µl Volumen verdünnt mit dem Puffer, in welchem sich die Liposomen befinden (üblicherweise 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,5). Zu den Ansätzen werden 60 µl Serum zugegeben und bis zu den entsprechenden Zeitpunkte bei 37. °C inkubiert. Der Nullzeitpunkt wird separat bestimmt.

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion wird mit PLG-Eppis (Phase-Lock-Gel-Eppendorfröhrchen) durchgeführt für eine gute Trennung der

15

Serumbestandteile und der Lipide von der siRNA. Die PLG-Eppis werden für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und auf Eis gestellt (im folgenden wird bei max. 4 °C gearbeitet). In die PLG-Eppis gibt man 280 µl Puffer (wie oben) und 45 µl 5 M NaCl.

- 5 In diese Lösung kommt der Ansatz der Liposomen im Serum (120 µl). Sofort danach erfolgt die Zugabe von 300 µl Phenol/Chloroform-Gemisch. Für den Nullwert gibt man zum Puffer mit NaCl in das PLG-Eppi auch 60 µl Serum. Alles wird sofort gemischt.

- 10 Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C. die wässrige Phase enthält die freie siRNA. Auf den Gradienten werden weitere 300 µl Chloroform gegeben und kurz gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation wie oben ist die wässrige Phase klar und kann möglichst vollständig abgenommen werden. Die siRNA wird nun aus der wässrigen Phase gefällt. Zur siRNA-Lösung gibt man 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und 2,5 Volumenteile Ethanol. Die Lösung wird gut durchmischt und die siRNA 1 h bei -70 °C ausgefällt. Eine weitere Zentrifugation bei 4°C, 13 000 rpm für 10 min folgt. Dabei pelletiert die siRNA. Der Überstand wird vollständig abgenommen und das Pellet wird mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und für ca. 10 min getrocknet. Die siRNA wird in 5 µl Wasser wieder gelöst.

- 20 Die Qualität der siRNA wird im denaturierenden und möglicherweise auch im nativen Acrylamidgel überprüft.

Nachweis der Doppelsträngigkeit von siRNA im nativen Acrylamidgel

- Die Qualität von siRNA wird über die vollständige Länge der Einzelstränge und die Doppelsträngigkeit definiert. Mittels eines nativen Acrylamidgels kann man die Doppelsträngigkeit einer siRNA überprüfen, da sich doppelsträngige siRNA langsamer im nativen Gel bewegt, als die Einzelstränge.

- 30 Das Gel muss mit TBE-Puffer 30 min vorlaufen (80 V, 100 mA), um die erforderliche Temperatur zu bekommen.

Es werden höchstens 2 µg siRNA pro Slot aufzutragen, da sonst das Gel überladen wird. Die Proben werden in einem Gesamtvolumen von 9 µl aufgenommen. Darauf gibt man 1 µl Blue Juice-Ladepuffer. Die Proben werden auf das vorgelaufene Gel aufgetragen und für 1 h bei 100 mA aufgetrennt.

- 35 Färben des Gels:

- Das Gel wird nach der Elektrophorese aus der Apparatur entnommen. Auf das Gel werden ca. 200 ml Stains All Gebrauchslösung (20 ml Stammlösung, 180 ml Formamid, 200 ml Wasser gegeben. Das Gel wird im Dunklen für 30 -60 min in der Stains All-Lösung gefärbt. Danach wird die Lösung vom Gel genommen und das Gel wird unter Lichtzutritt im Wasser entfärbt (ca. 30 min-2 h je nach Lichtintensität). Die siRNA bleibt gefärbt, wohingegen sich der Hintergrund wieder völlig entfärbt wird.

Beispiel 5

In vitro Aufnahme von amphoteren Liposomen mit Cy3-BCL2-Antisense in HepG2 Zellen

- 5 HepG2 Zellen werden 2 Tage vor der Transfektion in 96-Wellplatten ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Zelldichte von 60 - 80% zeigen ($0,02-0,2 \times 10^5$ in $100 \mu\text{l}$, i.d.R. 1×10^4). Es werden 2 Platten (Zentrifugation u. Kontrollinkubation) vorbereitet, die ansonsten identisch behandelt werden.

10

Transfektion:

Vortemperierung der Zentrifuge (Biofuge Stratos, Heraeus), Rotor # 3048 für Mikrotiterplatten. Cy3-Bcl2-Antisense-haltige Liposomen werden auf eine einheitliche Konzentration mit 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 (HBS) eingestellt (Cy-3 ist ein rot floureszierender Marker).

Herstellung der Liposomenverdünnungen (mit und ohne Cargo) sowie Transfektionsmix von kommerziellen Kontrolltransfektionsreagenzien (z.B. Lipofectamine 2000, Oligofecatmine, siPort Amine, siPort Lipid) auf 96-Well

20 Platte mit serumfreien Medium (ca. 160 ng Antisense/well). Die Liposomenverdünnung wird in einem Volumen von 25 - 50 μl zu den Zellen gegeben werden.

Die Zellen werden mit serumfreien Medium gewaschen (1x) und mit serumhaltigen oder serumfreien Medium versetzt, z.B. je Well 75 μl , wenn

25 die Liposomenverdünnungen so hergestellt wurden, dass die entsprechende Menge antisense/Well in 25 μl enthalten ist.

Eine Multiwellplatte wird bei 1,500 rpm (342 g), 1h, 37°C zentrifugiert, die Kontrollplatte 1 h inkubiert (37°C, 5% CO₂). Anschließend werden beide

Platten 3 h inkubiert (37°C, 5% CO₂).

- 30 Medium aller Wells komplett entfernen, 1 x mit PBS waschen, 2 x mit serumhaltigen Medium; Zusatz von serumhaltigen Medium zu allen Wells, mikroskopische Kontrolle auf Vitalität, anschließend beide Platten über Nacht inkubieren (37°C, 5% CO₂).

- 35 Am Tag nach der Transfektion wird die Aufnahme von Liposomen in die Zellen floureszenzmikroskopisch untersucht. In Abbildung 3 wird Fluoreszenzaufnahme neben einer Phasenkontrastaufnahme zur Zelllokalisierung gezeigt.

40

Ansprüche

1. Serumstabile amphotere liposomale Formulierungen mit mindestens einem Wirkstoff im wässrigen Innenraum, dadurch gekennzeichnet, dass

5 die Liposomen

-neutrale Lipide mit einem Membrananteil von 20 - 65 mol% umfassen,

-Cholesterol mit einem Anteil von 35 - 45 mol%,

als ladungstragende Lipide entweder

-amphotere Lipide mit einem Anteil von 5 - 20 mol%

10 oder

- Mischungen von kationischen und anionischen Lipiden mit einem Anteil von 15 - 45 mol% umfassen,

und der Wirkstoff ein Oligonukleotid umfasst.

2. Liposomalen Formulierung nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide aus 5-100, bevorzugt aus 5-40 und besonders

bevorzugt aus 10-25 Desoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden oder deren chemisch-modifizierten Derivaten aufgebaut sind.

20

3. Liposomalen Formulierung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide als Einzelstrang (z.B. Antisense-

25

Oligonukleotide), als Doppelstrang (z.B. small-interfering RNA, Decoy-Oligonukleotiden) oder in komplexer Faltung (z.B. Aptamere, Spiegelmere) vorliegen.

4. Liposomale Formulierung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Oligonukleotid ein Aptameres ist.

30

5. Liposomale Formulierung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Oligonukleotid ein Spiegelmeres ist.

35 6. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch

gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DMPS/Chol 40:10:10:40 hat.

7. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch

40

gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/AC/Chol 50:10:40 hat.

11

8. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/HisChol/DPPS/Chol 35:10:15:40 hat.

5 9. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/IschistsuccDG/Chol 50:10:40 hat.

10 10. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MOChol/DGSucc/Chol 35:10:15:40 hat.

11. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/MoChol/DGSucc/Chol 40:10:10:40 hat.

12. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/DGSucc/Chol 35:10:15:40 hat.

20 13. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DMPC/Hist-DG/Chol 50:10:40 hat.

25 14. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/MoChol/DPPS/Chol 40:10:10:40 hat.

30 15. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol 20:10:30:40 hat.

35 16. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistChol/Chol 50:10:40 hat.

40 17. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistDG/Chol 40:20:40 hat.

18. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/MoChol/DG-Succ/Chol 20:10:30:40 hat.

5 19. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HcChol/Chol 50:15:35 hat.

10 20. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HcChol/Chol 50:15:35 hat.

21. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HistPS/Chol 50:15:35 hat.

22. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistPS/Chol 50:15:35 hat.

20

23. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/AC/Chol 50:15:35 hat.

25 24. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/AC/Chol 50:15:35 hat.

30 25. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistChol/Chol 50:15:35 hat.

35 26. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HistChol/Chol 50:15:35 hat.

27. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HistSuccDG 60:40 hat.

40

20

28. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/HistSuccDG/Chol 50:15:35 hat.

5 29. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/IsoHistSuccDG/Chol 50:15:35 hat.

10 30. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung DPPC/HistSucc/Chol 50:15:35 hat.

31. Liposomale Formulierung nach einem der Ansprüche 1 -5, dadurch gekennzeichnet, dass die liposomale Membran die molare Zusammensetzung POPC/IsoHistSuccDG/Chol 50:15:35 hat.

32. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach Anspruch 1 -31 zur therapeutischen Behandlung eines Säugetieres.

20 33. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach Anspruch 1 -31 zur therapeutischen Behandlung eines Menschen.

34. Verwendung einer liposomalen Formulierung nach einem oder mehrerer der 25 Ansprüche 1 - 31 zur parenteralen Applikation, bevorzugt zur intravenösen Applikation.

35. Liposomale Formulierung nach Anspruch 1 -31, dadurch gekennzeichnet, dass sie keinen Wirkstoff enthält.

5

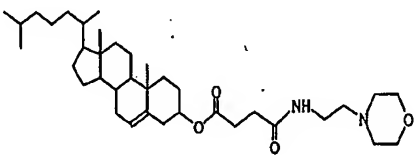
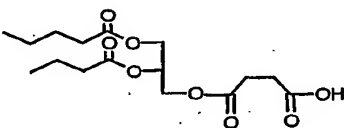
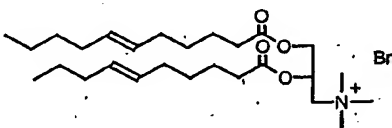
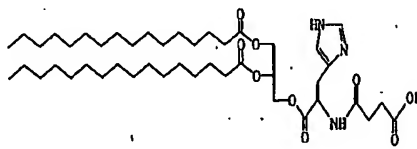
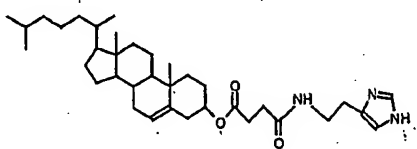
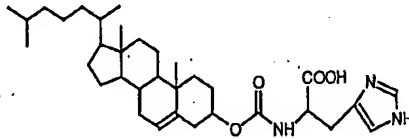
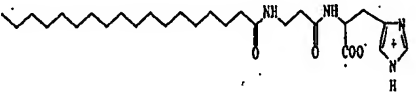
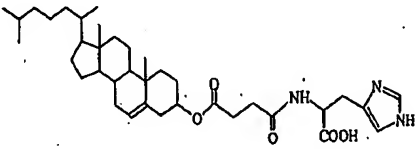
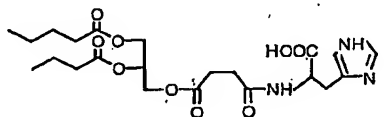
Serumstabile amphotere Liposomen

10

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft amphotere liposomale Formulierungen, die besondere Serumstabilität zeigen und sich zum intrazellulären Delivery von Oligonukleotiden eignen.

Figur 1
Abkürzungen und chemische Formeln verwendeter Lipide

MoChol 	DG-Succ 
DOTAP 	IsohistsuccDG 
HisChol 	HCChol 
AC 	
Hist-Chol 	
Hist-DG 	

U 28 03 04

22

Figure 2.
Pipetierschema für den Serumtest

Puffer				Serum			
	1. Basis	2. Triton	3. Basis	4. Triton	5. Basis	6. Triton	7. Basis
A t=null	For- mulie- rung 1	For- mulie- rung 2	For- mulie- rung 2	For- mulie- rung 1	For- mulie- rung 2	For- mulie- rung 2	For- mulie- rung 2
B t=null							
G-C		Analog	den	anderen	Zellen		
H t=24h							

U 28.03.04

23

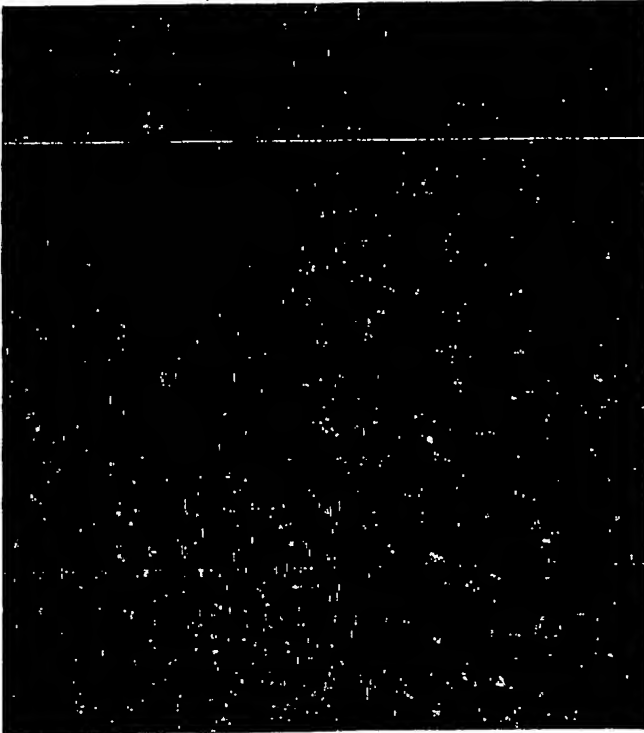
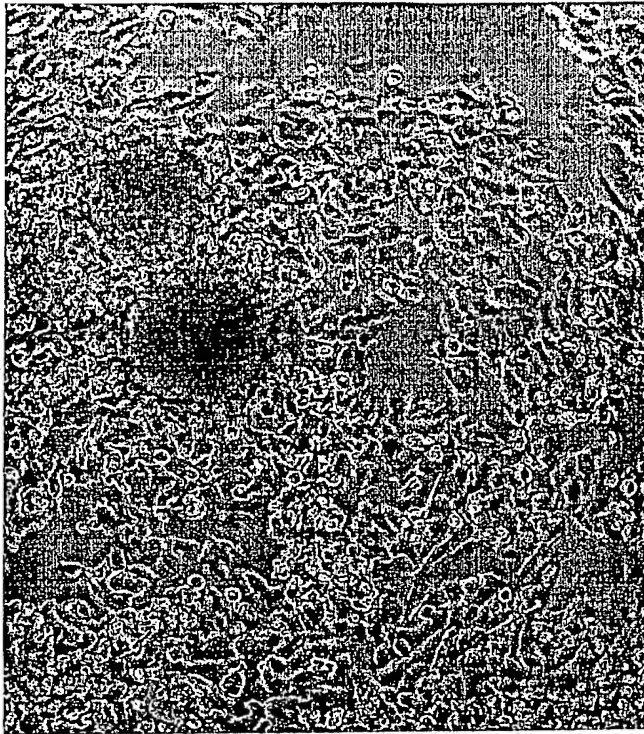


Abbildung 3

Tabelle 1

Nr	Lipidmischung	Verhältnis	Serumst- abilität	Nr	Lipidmischung	Verhältnis	Serumst- abilität
26	DMPC/MoChol/DMPS/Chol	40:10:10:40	+	HC10A	DPPC/HcChol/Chol	50:15:35	+
12	DMPC/AC/Chol	50:10:40	+	SC1Ea	POPC/HisChol/Chems	60:20:20	-
13	DMPC/HisChol/DPPS/Chol	35:10:15:40	+	SC1E	POPC/HisChol/Chems	50:15:35	-
15	DMPC/IsohistSuccDG/Chol	50:10:40	+	HC1Eb	DPPC/HisChol/Chems	60:20:20	-
09	DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	+	HC39	DPPC/DGSucc/Chems	50:15:35	-
10	DMPC/MoChol/DGSucc/Chol	40:10:10:40	+	SC7B	POPC/HistPS/Chol	50:15:35	+
11	POPC/MoChol/DGSucc/Chol	35:10:15:40	+	S7B	POPC/HistPS	60:40	-
05	DMPC/HistChol/Chol	50:10:40	+	HC7B	DPPC/HistPS/Chol	50:15:35	+
07	POPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	H7B	DPPC/HistPS	60:40	-
02	DMPC/Hist-DG/Chol/	50:10:40	+	SC3C	POPC/MoChol/Chems	50:15:35	-
03	DMPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	HC3C	DPPC/MoChol/Chems	50:15:35	-
06	POPC/MoChol/DPPS/Chol	40:10:10:40	+	SC19B	DPPC/DOTAP/Chems	50:15:35	-
2a	DPPC/DOTAP/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	SC6	POPC/AC/Chol	50:15:35	+
3a	DPPC/HistChol/Chol	50:10:40	+	S6	POPC/AC	60:40	-
4a	DPPC/HistDG/Chol	40:20:40	+	HC6	DPPC/AC/Chol	50:15:35	+
7a	DPPC/MoChol/DG-Succ/Chol	20:10:30:40	+	H6	DPPC/AC	60:40	-
4	DMPC/DOTAP/DG-Succ/Chol	29:14:43:14	-	HC12	DPPC/CHIM/Chems	50:15:35	-
1	DPPC/DOTAP/Chems/Chol	50:10:30:10	-	SC12	POPC/CHIM/Chems	50:15:35	-
X	DPPC/DOTAP/Chems	60:10:30	-	H34	DPPC/HistSuccDG	60:40	-
Y	POPC/DOTAP/Chems	60:10:30	-	S5	POPC/HistChol	60:40	-
6	DPPC/MoChol/Chems/Chol	50:10:30:10	-	SC34	POPC/HistSuccDG/Chol	50:15:35	+
SC10A	POPC/HcChol/Chol	50:15:35	+	HC35	DPPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35	+
HC5	DPPC/HistChol/Chol	50:15:35	+	SC35	POPC/IsoHistSuccDG/Chol	50:15:35	+
SC5	POPC/HistChol/Chol	50:15:35	+	HC34	DPPC/HistSucc/Chol	50:15:35	+